

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

① 日本国特許庁(JP)

② 特許出願公開

③ 公開特許公報(A)

昭63-119500

④ Int. Cl.

⑤ 特許庁

⑥ 特許庁

⑦ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/723

ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 等支請求 未請求 発明の頁 5 (全13頁)

⑧ 発明の名称 抗酸化多環体DS 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑨ 特 願 昭62-125443

⑩ 出 願 昭62(1987)5月22日

⑪ 優先権主張 ⑫ 昭61(1986)5月23日 ⑬ 日本(JP) ⑭ 特願 昭61-118847

⑮ 発 明 者 井 上 和 彦 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑯ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑰ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑱ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑲ 代 理 人 弁理士 有賀 三孝 外2名
最終頁に続く

明 細 書

グラフトーエーゼ

1. 発明の名称

蛋白質含量(%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

抗酸化多環体DS 4152並びにこれを含有

リン酸、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

塩)

2. 特許請求の範囲

(4) 比較例

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

(a) η_{sp}/c $-37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

を有する抗酸化多環体DS 4152。

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

(ii) 分子量(ゲル法による)

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)

22000 ± 3000

(6) 溶解性

(iii) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、ノタノール、エタノール等の有機溶媒

C 24.42~26.76% H 3.34~3.98%

には殆ど不溶。

N 0.51~0.89% S 10.6~11.7%

P 0.77~1.06%

(7) 着色反応

(iv) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸、アンスロン-反応、ビ

糖含量(%) : 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・マンガン反応およびエンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 濃度水溶液)

(9) 構成糖および炭酸基、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、10, H₂

およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソロビン酸、グルコサミンおよびムラニン酸の存在を認める。

次の図表第6項記載の血管新生抑制剤。

4. 炭酸化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な炭酸化多糖体 DS 4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、シクロコファス 19, AT-25 の発癌生物中に腫瘍増進作用、免疫抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体 DF 4639 が存在することが知られて

2. 炭酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、増殖性関節炎、未熟児網膜症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 炭酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5. 炭酸化多糖体 DS 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

4. ステロイドが糖質コルチ: iド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7. リューマチ性関節炎、増殖性関節炎、乾癬、増殖性関節炎、未熟児網膜症に有効な特許請求の範囲第7項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-35329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される炭酸化多糖体 DF 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をかねた結果、DF 4639 が強い発癌性を有することを知った。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発癌性物質を除去すべく、更に研究をかねたところ、DF 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちの DS 4152 と名づけられた一成分は発癌性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

ਜ਼ਾਬਤ 63-119500 (3)

更にまた、本陽明者は、この 03 4152 と
ステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作
用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されること
を見出した。

不発明は、上記の如見に基づくものであり、その目的は、新規な硬化多量体 Ds 4152 を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、炭酸化多環体
D3 4152 を有効成分として含有する血管新
生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、不明の他の目的は、炭酸化多量体
D: 4152 とステロイド剤とを有効成分とし
て含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提
供するものである。

本明圖書中の「血管新生抑制」とは、癌の

發育、實體形成、創傷の修復等に關して重要
なだけでなく、調節リユーマチを含む慢性疾患、
免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態においても
その身体の適量に強く関与している血管の新
生作用を調べることをいう。したがつて、血
管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与
する疾患、例えばリユーマチ性関節炎、増
殖性網膜炎、乾癬、糖尿病性網膜炎、末期兒
腎臓等の治療、予防に有用なものである。特
に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血
管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と
進展を促進するとされているので、抗血管新
生剤としても有効である。

本発明の受酸化多環体 D3 4152 は、アル
スロパクター sp.AT-25 (工業技術院微生物研

物工業技術研究所Kは、*Micrococcus* sp.
AT-25として、FERM P-5255及び
Aerobacter sp. AT-25として FERM
BP-1357の番号で登記されている)の培養
物から分離される BP 4639 (特開昭60-
07301号参照)から、その中に含まれる分
子量約 1.8×10^6 以上の陽電性物質等を適
当な分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外
ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつ
て得られる。

すなわち、ゲルろ過法によれば DP 4639
を溶媒をゲルろ過担体、例えば、セフアタリ
ル (Sephacel S-300 (ファルマシア製))
を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクシ
ョンについて高濃ゲルろ過クロマトグラフイ

一 (夏陣ソーゲダ 03000 SWカラム使用)
を行い、排除限界 (ポイド・ボリューム、
void volume) にピークを示すフラクション
(百分分) とポイド・ボリュームにピークを
与えガ分子量の $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲
に抽出されるフラクション (百分分) を各々
集め、濃縮する。

また、例外尹通は通気管系（例えば Amless
社製の YM10、YM30、XM50、PM30 や
Milliroc 社製の NOVA100、OMEGA100、
NOVA50、OMEGA50 等特に YM10）を用
い、窒素ガスによる加圧またはペリスタリフ
ク（peristaltic）ポンプによつて加圧（0.5
～5 kg/cm² 程度）し、透過液を DI 4152
として集めればよい。使用薬量は、水－エタ

特開昭63-119500(4)

ノール(10:2~3)または水が適量であり、4℃乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析液を濃縮後ろ過し、ろ液を数倍量のエタノール中に投下注ぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とするDS 4152(1面分)と補助性物質(2面分)が各々得られる。

こうして得られるDS 4152は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の特性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

20000±3000

(2) 元素分析値(300℃の値を示す)

ルン、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびユンヒドリン反応も陽性。カルベゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8(3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、3O,4L,およびP(糖)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.80% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(10) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 87±3(フェノール-硫酸法、ガラクトース還元)

蛋白含量(%): 1±0.5(ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(11) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(12) 紫外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)

(13) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(14) 構成アミノ酸およびアミノ糖

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイノシリン酸、グルコサミンおよびムンリン酸の存在を認める。

炭上のDS 4152は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、DS 4152の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、プレドニゾン、D-メチルプレドニゾン、デキサメタゾン等のステロイドホルモンが、癌促進作用、発がん、ヘルペス

一風量に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1305 (1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 769 (1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄激素コルチコイド(プレドニゾン、プレドニゾン、メタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Oncology 10 72 (1964))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、フオスフエート、アテルアセテート、テトラヒドロフタレート、トリメタルアセテート等);メタルプレドニゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート等);メタメタゾンおよびその誘導体(フオスフエート、ペレレート等)が挙げられる。

また、グルコルコルチコイドのC-11位の水酸基が=配位になつた異性体(たとえば、11 α -エピヘイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルコルコルチコイドのテトラヒドロ代謝物(グルコルコルチコイド活性の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の08 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄激素コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的に次のものが例示される。

(1) プレグナンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルコルコルチコイドであり、たとえばコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンダシレート等);ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、カプロエート等);プレドニゾンおよびその誘導体;プレドニ

メドキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等);ディドロゲステロンおよびその17 α -アセトキシ誘導体(デュフアストン)等が挙げられる。

更にまた、メタロコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメタルアセテート、エナンテート、フエメルプロピオネート等)も挙げられる。

(2) アンドロステンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、アテレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エピテストノールおよび

その誘導体、ヒドロコルチゾンがあげられる。
さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メテラステロンおよびその誘導体、メテノロンおよびその誘導体も含まれる。

- (2) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、性腺ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストラジオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を医薬的に許容される媒体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の塩液用剤に溶解させた液剤、散剤、錠剤、

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適量である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の DS 4152 はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と配合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、DS 4152 単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と配合させたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として有

用、散剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が DS 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して配合せ用とすることも、あるいは両成分を混合剤とし調剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、おぼろ、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152 として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、副腎コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適量で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(a)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られた DS 4639 (50%) を1.5mlの0.1M NiCl_2 に溶解し、これを0.1M NiCl_2 で平衡化したカラム（セファクリルS-300；50×80cm）にかけて同速度にて抽出し、18mlずつ抽出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル浸透クロマトグラフィー（東洋ソーダ製 83000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5）を行い、ポイド・ビュームにピークを与えず、

特開昭63-119500(7)

分子量(ゲラトラン値)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に抽出されるフラクションを集め(約700ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約50mlまで濃縮後ろ過した。ろ液を約400mlのエタノール中へ緩降下層下して、生成した沈殿を集め、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(50℃, 6時間)して目的物のDS 4152の白色粉末3.6gを得た。

一方、上記高濃アルブミン過クロマトグラフィーでボイド・ボリュームにピークを与えるフラクションを集め(約90ml)、上述のDS 4152の場合と同様に処理して、E成分を淡黄色粉末として0.18g得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭水素および糖の組成モル比

試体を1規定塩酸中100℃で5時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、炭水素および糖のモル比は、SおよびPの含量(%)から算出した。

表2

	ガラクトース	グルコース	炭水素	糖
DS 4152	0.1	1.0	7.3	0.6
DF 4639	0.2	1.0	7.3	0.6
E成分	0.2	1.0	6.9	0.6

表2は、グルコースを1.0モルとした場

DS 4152の物理化学的性質および生物学的性質をDF 4639およびそのE成分と比較して示す。

(c) 糖、蛋白、SおよびP含量(表1)

表1

	1) 糖(%)	2) S(%)	3) 蛋白(%)	4) P(%)
DS 4152	56	1.11	1.1	0.66
DF 4639	54	1.08	1.3	0.66
E成分	42	0.79	0.6	0.72

1) フェノール-炭酸法(ガラクトース換算)

2) アントノビラスの方法(C.A. Antonopoulos, *Acta Chem. Scand.* **16**, 1521 (1962))による

3) ローリー・フォリン法(牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法(P.S. Chen et al., *Anal. Chem.* **28**, 1756 (1956))による。

各の各成分のモル比の1例である。

(d) 組成アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152を3規定塩酸中、100℃16時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シアル酸、アミノ糖、グルコサミンおよびマンニンのピークを認めた。

(e) 比旋光度: $(\alpha)_D^{20}$ (c=0.5, 水)

表3

	比旋光度
DS 4152	-37
DF 4639	-36
E成分	-34

(f) ゲルろ過層出パターン

表1図、表2図および表3図に、それぞれ

特開63-119500 (B)

あると推定される。

(N) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に従って行った発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下空白

DS 4152、DF 4639 とよびH部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ03000 10カラム使用、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5、0.9ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(i) 常外相収収スペクトル

2ml/分流速において220~340nmに強大収収は認められない。

(ii) 赤外線収収スペクトル (KBr錠)

1240、840(肩)および810 cm^{-1} に、炭酸化多糖に特徴的な収収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フェosphateを介してメチルグリカン部の結合した炭酸化多糖体で

第4表

試 体	用 量 g/100ml	体積上昇量 ml					
		濃 度	計	+	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45		
	375	0.20	0.80	0.20	0.90		
DF 4639	15	1.55	1.25	1.40	4.20		
	75	1.40	2.00	1.60	5.20		
	15	1.90	1.40	2.20	5.50		
H部分	75	1.80	1.75	2.65	6.20		

・+ (同位)。(一) (無性)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000mg/kg以上であった。

実施例1 (例)

DF 4639 (50g)を300mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、TM10膜(41.8 cm^2 、アicon社製)を用いて、真空で加圧(1.5kg/ cm^2)下、室温で限外ろ過した。上記ろ液を逐次しながら透過液量が約3Lとなるまで実施した。透過液の濃縮液(約50ml)に100mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、過心分離により得られる上清を約500mlのエタノール中へ投下し下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55℃、3時間)してDS 4152

特開昭63-119500 (9)

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す如く、
蛋白、S及びPの含量を除き、実施例1(A)の
DS 4152 と同一であつた。

糖含量 58%
S含量 11.3%
蛋白含量 0.9%
P含量 0.92%

高速ゲル浸透クロマトグラムを第4図に示
す(0.3000 Mカラム、0.1M酢酸ナトリ
ウム緩衝液(pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実施例2

局所性尿管新生阻止試験(直接法)：

局所を用い、ナイターとフォーケマン

(Nature 207:307, (1962))の方法を—

べた。ステロイドとしては、局所コルチゾン
を0.5 mg/局所の量(尿管新生に影響のない
量)を用いた。また、比較として、DP 4639
及びE面分についてもその活性を調べた。こ
の結果を第5表に示す。

第5表

50%尿管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	E面分
ID ₅₀ 値 (mg/局所)	3	30	600

実施例4

実施例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用によるID₅₀値の変化を檢
討した。この結果、種々のステロイドに10

倍改良した以下の方法で行つた。

局(ノーランクロス)の4~5日経受後局
の尿管部に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。

培養後2日後に、尿管部血管の発達度を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、ア
ロビット法により、50%尿管新生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 のID₅₀値
は、160 mgでもあつた。これに対し、ヘパ
リンは、100 mgでも作用を示さなかつた。

実施例3

局所性尿管新生阻止試験(直接法)：

実施例2と同様な方法で、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの局
所性尿管新生阻止活性が16~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(mg/embryo)	
	単 独	DS 4152 (増加) と併用 (倍率)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
6α-メチルプレドニゾン	115	003 (383)
ベタメタゾン	080	003 (160)
テトラヒドロ8	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
17β-エストラジオール	112	042 (27)
17β-エストラジオール	106	028 (70)
フルオキシメステロン	124	012 (103)
5α-アンドロステロン	252	029 (8)

特開昭63-119500 (10)

この結果から明らかなように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様に、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を5mg/kgの割合で用い、DS 4152 は300mg/kg又は3000mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較として OF 4639 及び E 画分を用いた。この結果を第8表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した尿原尿血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%タエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、血液法と同様に5日経受得尿原尿に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

第8表

投与ルート	DS 4152	OF 4639	E 画分
皮下	922%	833%	868%
経口	927%	868%	828%

DS 4152 及び OF 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても尿原尿血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (in vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与6時間後に採血し、0.313%タエン

以下余白

表10A

物質名 (ルート)	投与量 (mg/kg)	DS 4152投与量 (mg/kg, p.o.)	癌発生抑制率 (%)
コナソノブチレート (p.o.)	0	0	27
		30	75.1
ナトナイド08 (p.o.)	1	0	-26
		30	71.7
	0	0	-123
		30	80.7
	0	0	40
		30	82
エトキシノール (i.m.)	0	0	18.4
		30	23.4
	100	0	24.2
		30	37.6

実施例8

試験方法:

C57BL/6雄マウスに同系の卵巣切除後、水腫腫瘍MS076を 1×10^6 個皮下接種し、5日目よりDS 4152を30mg/kg/日1回、6回皮下投与したところ、著大な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10表に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%抑制) であり、かつノディアン生存日数が対照群より33%延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍塊の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例9

試験方法:

ICR系雄マウス (5週齢) にインナーマ160 (8160) を 1×10^6 個皮下接種し、3日目より酢酸コナソンの生理食塩水懸濁液を250mg/kg/日8回割合で3日間、100mg/kg/日8回割合で1日投与した。

DS 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/マウスとなる投与1日1回皮下もしくは腹腔にて4日間投与した。移植7日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第11表に示す如く酢酸コナソンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらにDS 4152を投与することにより腫瘍増殖抑制作用が得ら

表10A

腫瘍系	群	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 (mg)	生存率 (%)
MS076	対照群	0	230±0.18 (100)	0
	DS 4152投与群	30	149±0.09 (37)	33

(a) 移植21日目の平均腫瘍重量±標準偏差、(b) は平均生存率。

(c) (a) 腫瘍重量のノディアン生存日数/対照群のノディアン生存日数 $\times 100$

れ、打錠後の減量重量の60~175%であつた。

表11 表

試 験	減量重量	
	平均値±標準偏差	T/C%
生理食塩水(90)	Q361±Q191	1000
生理食塩水(10)	Q391±Q122	1000
酢酸コルチゾン	Q340±Q162	942
DS 4152 (Q61mg/..... 90)	Q361±Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/..... 90)	Q261±Q077	723
DS 4152 (Q61mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q063±Q016	175*
DS 4152 (Q1mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q028±Q011	74*
DS 4152 (Q61mg/..... 90)	Q322±Q071	824
DS 4152 (Q1mg/..... 90)	Q355±Q115	908
DS 4152 (Q61mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q063±Q036	161**
DS 4152 (Q1mg/..... 90) +酢酸コルチゾン	Q036±Q016	69**

* P<0.05, ** P<0.01 ステューデントt-検定による

試薬は注射用とする。

実施例12

投用：

DS 4152 60mg、アレドニゾン20mg、乳糖30mg、トクモロコシゲンアン135mg、カルバキチンナメルセルローズカルシウム5mg、ヒドロキシプロピルセルローズ3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以 上

特開2003-119500 (12)

実施例10

製剤例：

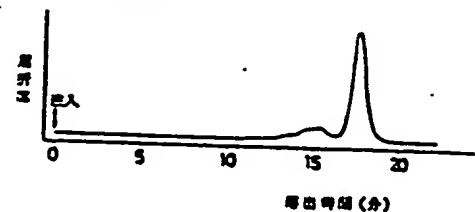
DS 4152 60mg、乳糖300mg、トクモロコシゲンアン144mg、カルバキチンナメルローズカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルローズ30mgを用い、常法に従つて300mgの錠剤を調製した。この錠剤は錠状にあらせて1850.0mg〜5mgを服用する。

実施例11

注射用：

DS 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をメンブランフィルターで濾過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

第1図



第2図

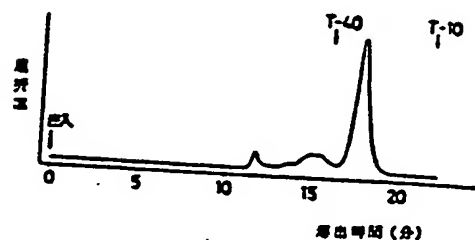


図 3

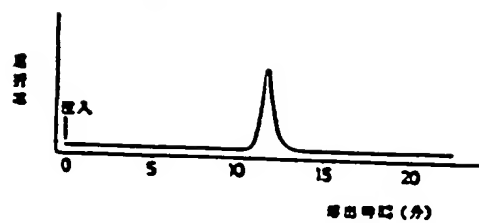
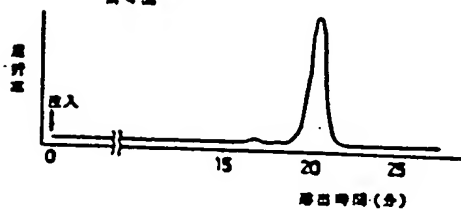


図 4



第 1 頁の続き

④ Int. Cl. 8

A 61 K 31/723
37/02
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04
// (A 61 K 31/723
31:56)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

発明者 小 河

秀 正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内